

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2003年 3月 7日

出 願 番 号

Application Number:

特願2003-061203

[ST.10/C]:

[JP 2003-061203]

出 願 人

Applicant(s):

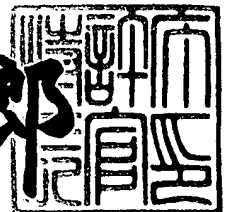
名古屋大学長

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2003年 4月18日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3028471

【書類名】 特許願

【整理番号】 U2002P259

【提出日】 平成15年 3月 7日

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 G06F 5/00
H04L 12/00

【発明の名称】 生物発光測定・解析プログラム、該プログラムを記憶したコンピュータ読み取り可能な記録媒体並びに該プログラムおよび該コンピュータを含む生物発光測定・解析装置

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市北区清水4丁目3番10号

【氏名】 石浦 正寛

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市昭和区宮東302丁目2番地 プレスイン山手3-D

【氏名】 岡本 和久

【特許出願人】

【識別番号】 391012224

【氏名又は名称】 名古屋大学長 松尾 稔

【代理人】

【識別番号】 100072051

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】 100059258

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 暁秀

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9709851

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生物発光測定・解析プログラム、該プログラムを記憶したコンピュータ読み取り可能な記録媒体並びに該プログラムおよび該コンピュータを含む生物発光測定・解析装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 コンピュータに対して、所定時点でリアルタイムに送られてくる生物試料の発光測定結果信号を受ける機能と、該生物試料発光測定結果信号に基づいて生物試料発光測定結果をリアルタイムで表示し保持する機能と、所定時間後にリアルタイムに送られてくる新たな生物試料発光測定結果信号を受ける機能と、該新たな生物試料発光測定結果信号に基づいて該生物試料発光測定結果を該新たな生物試料発光測定結果によりリアルタイムで更新表示し保持する機能とを繰り返し実行させる、生物試料 発光測定・解析プログラム。

【請求項 2】 コンピュータに対して、複数の生物試料の発光測定結果信号を受ける機能と、該複数の生物試料の各々の生物試料について、発光測定結果信号に基づいて生物試料発光測定結果をリアルタイムで表示し保持する機能と、所定時間後にリアルタイムに送られてくる新たな生物試料発光測定結果信号を受ける機能と、該新たな生物試料発光測定結果信号に基づいて該生物試料発光測定結果を該新たな生物試料発光測定結果にリアルタイムで更新表示し保持する機能とを繰り返し実行させ、それによって該複数の生物試料生物試料について、生物試料発光測定結果をリアルタイムで並べて表示して比較検討を可能とする機能を実行させる、請求項 1 の生物試料発光測定・解析プログラム。

【請求項 3】 コンピュータに対して、さらに、各時点でリアルタイムに送られてくる生物試料の発光測定結果信号を受け、該生物試料発光測定結果信号に基づいてリアルタイムでの生物試料発光測定結果の表示内容を記憶させ、それぞれの時点で記憶させた生物試料発光測定結果の表示内容の比較を可能とする機能を実行させる、請求項 1 または 2 の生物試料発光測定・解析プログラム。

【請求項 4】 コンピュータに対して、さらに、各時点でリアルタイムに受けた生物試料の発光測定結果信号に基づいて、リアルタイムでそれぞれの試料毎に発光値の時系列による変動のリズム成分を解析し表示する機能を実行させる、請求

項 1 乃至 3 のいずれかの生物試料発光測定・解析プログラム。

【請求項 5】 コンピュータに対して、さらに、各時点でリアルタイムに受けた生物試料の発光測定結果信号に基づいて請求項 4 の解析を行って得た結果に対して統計的処理を行い突然変異体のスクリーニングをする機能を実行させる、請求項 4 の生物試料発光測定・解析プログラム。

【請求項 6】 コンピュータに対して、さらに、解析結果をプリンターにプリントさせるためのプリント信号を出力する機能を実行させる、請求項 1 乃至 5 のいずれかの生物試料発光測定・解析プログラム。

【請求項 7】 請求項 1 乃至 6 のいずれかのプログラムを記憶したコンピュータ読取り可能な記録媒体。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生物発光測定・解析プログラムおよびプログラムを記憶したコンピュータ読取り可能な記録媒体に関する。本発明は、特にゲノムワイドの遺伝子発現の研究、品種改良のための突然変異体作製に好適に適用できる。また、本発明は、特に「生物発光リズム測定・解析プログラム」として適合する。 「リズム測定・解析」とは、生物試料を測定した場合に、経時的に変化を追っていくことになり、測定が数日に渡り、測定・解析結果が生物の約一日周期のリズムを示すことに由来する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

従来の生物発光測定では、CPUに負担がかかるために測定データ処理のための表計算ソフトと解析ソフトとを生物発光測定装置の制御プログラムとは同時に起動できず、測定結果は一旦測定装置の制御プログラムによって測定装置のコンピュータにテキストファイルとして保存し、測定終了後に改めてマクロプログラムを介して該表計算ソフトに読み込み、外部プログラムを呼び出してデータ解析を行っている。例えば、非特許文献 1 参照。

【0 0 0 3】

【非特許文献 1】

“Novel features of *Drosophila* period transcription revealed by real-time luciferase reporting” 著者：Christian Brandes 他、掲載：Neuron, Vol. 16, 687-692 ページ

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

そのため測定期間中にはリアルタイムで途中経過を知ることができず、測定の途中経過に合わせて柔軟に実験を実施することは不可能であった。

また、従来の生物発光測定では統計処理機能を備えていないために、大規模測定には対応できておらず、測定終了後の実験結果の判定に手間取っていた（その間装置は稼働停止状態）。特に突然変異体の大規模スクリーニングを行う際の突然変異体の選抜には長時間を要していた。そのため生物発光測定装置の能力をフルには発揮できていなかった。

【0005】

大量サンプルの遺伝子発現の強さの変動を生きたままの細胞で連続的に測定できる生物発光リアルタイム測定法は、任意の鍵遺伝子の発現制御に関与する突然変異体の網羅的分離に極めて有効な実験法であり、ポストゲノム時代の網羅的ゲノム機能解析の切札である。しかしながら、生物発光リアルタイム測定法の長所を最大限に活用し、測定の大規模化に対応する、データの表示・解析に関するソフトウェアの整備はなされていない。

【0006】

本発明の目的は、コンピュータを用いて、生物発光リアルタイム測定法の長所を最大限に活用し、測定の大規模化に対応する、データの表示・解析を可能とするコンピュータプログラムを提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、上記目的を達成するための生物試料発光測定・解析プログラムを提供することにより、該プログラムは、コンピュータに対して、所定時点でリアルタイムに送られてくる生物試料の発光測定結果信号を受ける機能と、該生物試料

発光測定結果信号に基づいて生物試料発光測定結果をリアルタイムで表示し保持する機能と、所定時間後にリアルタイムに送られてくる新たな生物試料発光測定結果信号を受ける機能と、該新たな生物試料発光測定結果信号に基づいて該生物試料発光測定結果を該新たな生物試料発光測定結果にリアルタイムで更新表示し保持する機能とを繰り返し実行させることを特徴とする。

【 0 0 0 8 】

本発明に係る生物試料発光測定・解析プログラムによって、測定中における測定データのリアルタイム表示を可能とする。これによって測定中に結果を直接見ることができるようになり、進行中の測定を必要な最短時間で切り上げたり、途中で次の実験の準備を柔軟に実施したりできるようになり、生物発光リアルタイム測定法の実験効率の向上することができる。

【 0 0 0 9 】

以下に本発明に係る生物試料発光測定・解析プログラムの好ましい態様を挙げる。特に矛盾がなければ、以下に挙げる好ましい態様を任意に組み合わせた態様も本発明の好ましい態様である。

(1) コンピュータに対して、複数の生物試料の発光測定結果信号を受ける機能と、該複数の生物試料の各々の生物試料について、発光測定結果信号に基づいて生物試料発光測定結果をリアルタイムで表示し保持する機能と、所定時間後にリアルタイムに送られてくる新たな生物試料発光測定結果信号を受ける機能と、該新たな生物試料発光測定結果信号に基づいて該生物試料発光測定結果を該新たな生物試料発光測定結果によりリアルタイムで更新表示し保持する機能とを繰り返し実行させ、それによって該複数の生物試料生物試料について、生物試料発光測定結果をリアルタイムで並べて表示して比較検討を可能とする機能を実行させる。

【 0 0 1 0 】

本態様によれば、例えば、生物試料発光解析に 9 6 穴プレートを使用する場合に、一度に 9 6 サンプルのデータをまとめて見ることができ、網羅的な大規模測定実験で得られた膨大なデータを短時間で詳細に検討することができる。下記の印刷機能と相俟って、上記網羅的な大規模測定実験で得られた膨大なデータを、

目的に応じて様々な縮尺で印刷し、短時間でより詳細に検討することができる。
したがって、測定データや解析結果の表示および印刷機能を顕著に強化することができる。

【 0 0 1 1 】

(2) コンピュータに対して、さらに、各時点でリアルタイムに送られてくる生物試料の発光測定結果信号を受け、該生物試料発光測定結果信号に基づいてリアルタイムでの生物試料発光測定結果の表示内容を記憶させ、それぞれの時点で記憶させた生物試料発光測定結果の表示内容の比較を可能とする機能を実行させる。

【 0 0 1 2 】

本態様によれば、リアルタイムでの生物試料発光測定結果の表示内容を記憶させ、それぞれの時点で記憶させた生物試料発光測定結果の表示内容の比較が可能となるので、生物試料の発光の経時的变化をリアルタイムで適確に把握できる。適確に把握することによって、以下のことが可能となる。

(A) 「次回以降の測定に当たって、フィードバックをして培養条件等を変える」、(B) 「刺激を与えて反応を見てみる」、(C) 「必要最小限の時間で切り上げて次の実験を行う」の3点の全てにおいて重要である。

【 0 0 1 3 】

突然変異体のスクリーニングにあたっては、まず適切な測定条件を決めるために、毎回測定条件を変えて最適な条件を詰めていくため(A)が重要である。条件スクリーニングが始まってしまえば短時間にできるだけ多くの試料を測定するために(C)が重要になる。刺激に対する反応を見ることができれば(B)、初めの刺激の影響が終わって次の刺激を与えて良いか否かがすぐにわかり、次に与える刺激をより強い物にすべきなのか弱いものにすべきなのかの見当がつく。条件決定の際に有用で、現在、主に測定している材料の測定条件を決める際には、分解の速い発光基質を試料に加えて、一過的に上昇した発光が減衰する時間を観測して、追加する基質の種類や量を検討する。極論すれば(B)の実用的な機能は(A)と(C)に等しいものであるが、研究者は自分の行っている実験の結果をできるだけ早く知ることを望んでいる。

【 0 0 1 4 】

(3) コンピュータに対して、さらに、各時点でリアルタイムに受けた生物試料の発光測定結果信号に基づいて、リアルタイムでそれぞれの試料毎に発光値の時系列による変動のリズム成分を解析し表示する機能を実行させる。

従来のシンチレーションカウンターを使用したシステムでは1プレート(96穴)分のデータがテキストファイルとして順に出力されるだけなので、それぞれの穴の発光値がどのように変動しているかを知ることはできない。本発明に係るプログラムは毎回の測定で出力されるテキストファイルの各穴の測定値を抜き出し、それぞれの穴の発光値を時刻毎に記録する。記録された各穴の発光値は本発明のプログラムのグラフ描画領域に表示される。

【 0 0 1 5 】

各プレートそれぞれの穴に入っている試料の発光値の変動の仕方に何らかの法則が有るとした場合、大抵は次の二つになると考えられる。――(A)直線的な変動：値が時間の経過に比例して大きくなっていく場合、(B)周期的な変動：値が時間の経過に伴って定期的に大きくなったり、小さくなったりを繰り返している場合。――本発明のプログラムは主に(B)の周期的な変動の法則性を明らかにし、「周期の長さ」や「最大・最低値を示す位相」、「振動の振幅」、「計算した周期の長さの計算精度」などを計算することに有効である。(B)について、「発光値の時系列による変動のリズム成分」の解析という。

【 0 0 1 6 】

(4) コンピュータに対して、さらに、各時点でリアルタイムに受けた生物試料の発光測定結果信号に基づいて上記(3)の解析を行って得た結果に対して統計的処理を行い突然変異体のスクリーニングをする機能を実行させる。

【 0 0 1 7 】

本態様によれば、コンピュータに対して統計処理機能を行い突然変異体のスクリーニングをする機能を実行させるようにしたので、測定結果の平均値やデータの分散を容易に知ることができ、また特異な値を示す突然変異体を容易に見つけることを可能にする。従来のプログラムに欠けていた統計処理機能を実行させることを付加することで、生物発光リアルタイム測定法は変異体の大規模スクリー

ニングにおける有用性を最大限に発揮することができる。

【0018】

(5) コンピュータに対して、さらに、解析結果をプリンターにプリントさせるためのプリント信号を出力する機能を実行させる。

測定結果の平均値やデータの分散を容易に知ることができ、また特異な値を示す突然変異体を、解析により算出したリズム周期や位相の、例えば、最大1920個(20プレート×96穴 = 1920試料)のデータの平均値やデータの標準偏差、分散のヒストグラム(例: 周期の長さヒストグラムを描画すると、24.0時間を示すデータは210個、24.1時間を示すデータは190個、24.2時間なら120個・・・という風に数え、横軸にデータ値、縦軸にそのデータ値を持つデータの数をプロットします)を計算して描画する。

【0019】

本態様によれば、測定データや解析結果の表示・印刷に関する機能を著しく強化する。例えば、生物試料発光解析に96穴プレートを使用する場合に、一度に96サンプルのデータをまとめて見たり、目的に応じて様々な縮尺で印刷したりできる。その結果として、網羅的な大規模測定実験で得られた膨大なデータを短時間で詳細に検討することができる。

【0020】

「測定データや解析結果の表示・印用に関する機能を著しく強化する」について付言すると、そもそも、シンチレーションカウンターの出力する値そのままでは一連の測定結果をまとめたデータとして見ることも印刷することもできないが、従来からあったExcelのマクロではその表示・印刷機能は貧弱であった(96穴分のデータをプロットするとシートのサイズが1画面には収まりきらず、印刷すると8ページになり、解析結果の値は別に印刷される)。本発明のプログラムでは96穴のデータを一画面で見ることができ、印刷した場合には(設定した縮尺によるが)最小で2ページ(両面印刷で紙一枚)に測定結果を解析結果と共に印刷することができる。

【0021】

本プログラムが上記の機能を実現したことで、生物発光リアルタイム測定法は

ポストゲノム時代の網羅的ゲノム機能解析の切札として、また突然変異体の網羅的分離において極めて有効な手法となった。

近年、種々の生物で全ゲノム配列が次々と決定され、時代はこのゲノム情報を基盤とするゲノム機能の網羅的解析を行うポストゲノム時代に突入した。ゲノム機能解析法としては、DNAアレイ法が有用である。本発明は、これを補完する実験法として生物発光リアルタイム測定法による遺伝子発現のリアルタイム測定法を提供するものである。大規模化を計ることにより、この手法をゲノム機能の網羅的解析の切札とすることができる。

【 0 0 2 2 】

測定データを高精度で容易に解析できるようになった。従来のデータ解析ソフトウェアと比べて、プログラムの解析精度・取り扱いの容易さを大幅に向上させる。

従来のものでは、ExcelのマクロプログラムからMS-DOSプログラムを呼び出して解析を行うために、解析期間中は他のプログラムの動作に支障をきたしていた。また、データの中に解析して欲しくない不要な期間のものがあつた場合に、従来のものではそれを除外して解析することが困難であつた。本発明のプログラムでは解析の際にデータの傾向にあつた複数の解析方法を選択することができ、解析区間や計算する周期の範囲などのパラメータを任意に設定できる。

【 0 0 2 3 】

本発明のさらに別の目的は、上記いずれかのプログラムを記憶したコンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供することにある。

【 0 0 2 4 】

【発明の実施の態様】

以下に、図面を参照して本発明をより具体的に詳細に説明する。但し、図示する実施態様は本発明を説明するためのもので、本発明を制限するものと解してはならない。

(1) 生物試料

本発明において、発光測定を行うための生物試料としては、例えば、生物発光測定のために、先ず生物発光遺伝子を組み込んだ生物試料を挙げることができる

。該生物試料は遺伝子操作によって作出することができる。この組換え発光生物体のゲノム配列中には、遺伝子発現を制御するプロモーター領域の後ろに蛍のルシフェラーゼなどの発光遺伝子を繋いで組込んであり、プロモーターの転写活性を生物発光として生きたままの細胞でリアルタイムで測定することができる（図 1 A）。この組換え生物体を 9 6 穴プレートに入れて透明なシールで封じて測定用試料として用いる（図 1 B）。

【 0 0 2 5 】

上記生物試料以外の生物試料について以下に付記する。

本発明のプログラムは E x c e l ファイルからの読み込み機能を持っているので、「リズム解析機能」や「表示・印刷機能」はあらゆる測定データに対して適用することができる。例えば、マイクロアレイを用いた遺伝子発現の測定によって得られた 3 0 0 0 遺伝子の発現を本プログラムで解析することができる。

【 0 0 2 6 】

「リアルタイム測定機能」に対応しているハードウェアは現在のところ生物発光測定のみである。ただし、生物発光測定は遺伝子組み換えが可能な全ての生物に対して行うことができ、任意のあらゆる遺伝子の発現量を測定できる応用範囲の広い技術である。また、「リアルタイム測定」は生物を生かしたまま行える様々な測定で有効に機能する。例えば、以下のものを挙げることができる。

【 0 0 2 7 】

「培養神経細胞の発する電気パルス」、「培養細胞の分裂速度」、「培養細胞の分泌するホルモン濃度」、「動物の脳に探針を打ち込んで行う神経パルス、ホルモン濃度の測定」、「バクテリアからハエ～人間に至る生物の動きの活発さ」、「動物の体温」、「植物の葉の動き」等。特に「培養神経細胞の発する電気パルス」は一度に測定できるサンプル数が多いので、対応するハードウェアを用いることによって本プログラムが極めて有効に機能する。

【 0 0 2 8 】

（ 2 ） 生物試料発光測定装置

図 2 に示すように、生物試料発光測定装置 1 は、生物試料 2 （ 9 6 穴プレート等）をセットし培養する培養部 4、生物試料の発光測定部 6、培養部 6 にある生

物試料 2 を発光測定部 6 に搬送しセットした発光測定部 6 にある生物試料 2 を培養部 4 に搬送しセットする搬送手段 8 とからなる。

【 0 0 2 9 】

培養部 4 は、植物等の生物試料を均一な条件で培養する設定されており、搬送手段 8 は、培養部 4 と生物試料発光測定部 6 との間に延びる搬送レール 1 0、搬送レール 1 0 に沿って培養部 4 と生物試料発光測定部 6 の間を移動する移送用アーム 1 2 とからなっており、移送用アームは図示しないコンピュータによってレールに沿って培養部 4 と測定部 6 との間を X 方向に、また生物試料を取り上げまたセットする位置に移動するため Y 方向に、また生物試料を把持するため Z 方向に移動可能となっている。いる。培養部 4 の培養条件および搬送手段 8 の搬送操作は、内蔵シーケンシャル・コントローラ（図示せず）によって制御されている。生物試料（例えば、プレート）の枚数、測定のサイクル数、測定タイミング等の制御は該シーケンシャル・コントローラで行われる。培養部及び搬送部の操作は、例えば付属のタッチパネルで行なう。該シーケンシャル・コントローラには、下記のシンチレーションカウンターとの間で通信をし、生物試料 2 を発光測定部 6 に搬送しセットした後、測定部で測定を開始させる信号を送るプログラムが組み込まれている。

【 0 0 3 0 】

（ 2 ）生物試料の発光測定部

生物試料の発光測定部 6 は、生物試料をセットする試料セット部 1 4、試料セット部の生物試料からの発光を測定するシンチレーションカウンター等のセンサー 1 6、センサーからの信号を受ける発光測定部コンピュータ 1 8 からなり、搬送部が生物試料 2 を発光測定部 6 に搬送しセットし、発光測定部コンピュータ 1 8 は、測定開始させる信号を受け取った後、所定のプログラムに沿って測定の開始・実行を制御する。測定は、例えば、1 枚目の 9 6 穴プレートの 1 行目の 1 列目、2 列目、・・・の位置の穴の生物試料について行ない、かつ 2 枚目、3 枚目・・・の 9 6 穴プレートについても同様に測定が実施し、測定結果は本発明のプログラムを読み取り実行するコンピュータ 2 0 に送られる。なお、測定結果の出力は測定部コンピュータ 1 8 の任意のディレクトリーに行われる。例えば、測定

部は測定部制御のためのWindows（登録商標）NTをOSとしたパソコンを内蔵し、測定開始の信号を受け取ったら付属の制御プログラムに従って測定を行い、結果の出力を任意のディレクトリーに行う。

【0031】

本発明と異なり、ハードウェアを制御しているコンピュータで「生物発光測定・解析プログラム」が作動させると、以下の不都合がある。

A) データを観察するために人間が操作する際に誤って測定そのものにトラブルを起こしてしまう危険性がある。

b) 生物試料発光測定装置自体は温度管理された培養室内に設置されているが、人間がデータ観察のために頻繁に培養室に出入りすると培養室の温度などに影響を及ぼす危険性がある。

【0032】

(3) 生物試料発光測定・解析プログラム

以下に、生物試料発光測定・解析プログラムについて説明する。

① リアルタイム

当該生物試料発光測定・解析プログラムは、コンピュータに対して、所定時点でリアルタイムに送られてくる生物試料の発光測定結果信号を受ける機能を実行させる。例えば、培養部に20枚までの96穴プレートを設置できるとして、シンチレーションカウンタが1枚の96穴プレートを測定するのに6分かかるとする。1プレート測定する毎にデータをコンピュータに転送するとすると、簡単にするために搬送時間を考えないと、1サイクル（20プレート分をまとめて1サイクルという）毎に転送するなら120分置きにコンピュータ20に新しい測定結果が送られてくることになる。本発明での「リアルタイム」とは、このような時間的間隔をいう。

【0033】

即ち、本発明は生物発光遺伝子を組み込んだ生物試料等の生物試料を対象とし、細胞が生きたままでの発光現象を測定・解析するためのプログラムであり、一般に1～7日間に渡って測定が行われるもので、上記時間間隔のレベルでの「リアルタイム測定」で十分な測定・解析結果を得られる。測定期間が数日に渡る長

い測定であるから、現在の試料測定をしている間にその様子を測定して次の測定に反映することが重要となる

【0034】

② 「生物試料発光測定結果をリアルタイムで（更新）表示し保持させる機能」については、既に上で挙げた3つの点が重要となる。

③ 測定はそれぞれの位置の試料（1枚目の96穴プレートの2列目、3行目の位置にある穴）が各データポイント（測定開始から2時間後、4時間後、・・・192時間後）毎について、どのように変化していくかを調べ、解析は変化の仕方を明らかにする。この変化は生物を測定した場合には、約一日周期のリズムを示すため、リズム解析を行なう。

【0035】

リズム解析の手法としてパワースペクトル法や視察法を用いている（パワースペクトル法および視察法は当該技術分野で周知の解析方法であり、「生体リズムの研究 著：本間研一、他、刊行：北海道大学図書」等に解説されている）。すなわち、簡単に述べると、パワースペクトル法は、様々な周期の正弦波を作成し、そのうち最も元データと近似しているものを正しい周期として決定することによって元のデータの周期成分を決定する方法であり、視察法は解析元データのピークを複数検出し、その間隔の平均を計算することによって周期の長さを計算する方法である。

【0036】

④ 統計処理について

統計処理の内容については先の類似項目で述べたが、さらに解説を加える。

解析により算出したリズム周期や位相の最大1920個（20プレート×96穴＝1920試料）のデータの平均値やデータの標準偏差、分散のヒストグラム（例：周期の長さヒストグラムを描画すると、24.0時間を示すデータは210個、24.1時間を示すデータは190個、24.2時間なら120個・・・という風に数え、横軸にデータ値、縦軸にそのデータ値を持つデータの数をプロットする）を計算して描画する。このヒストグラムを見ればデータの標準値の分布を把握することができ、標準から外れた値（＝突然変異体を示す値）を容易

に知ることができる。

【0037】

このヒストグラムで得られた値を参考に標準から離れた値を示す試料を「ピックアップ・ウィンドウ」で選ぶ。例えば平均の発光値が1万で周期が24時間のデータ群に対して、ここでの選択条件で「周期が28時間以上、かつ発光値の平均が2万以上」と設定すれば周期が極端に長く、発光の強い試料が選択される（解析ウインドウなどで穴を示す位置に黒い点がつく）。

【0038】

図3に、解析ソフトの持つウィンドウとその機能について説明する。なお、図3に示す画面は図2のコンピュータ20であっても良いし、あるいはコンピュータ20と他に設けた別のコンピュータ（図示せず）であっても良い。この場合、適当な通信ソフトでコンピュータ20の解析結果を該別のコンピュータに送るようにする。なお、図4には、図3のA、E、FおよびGを3A、3E、3Fおよび3Gと表示して示しており、図5、図6および図7はそれぞれ図3のB、CおよびDをそれぞれ3B、3Cおよび3Dと表示して示してある。

【0039】

(1) 図3A

コンピュータのソフト起動ウインドウを示す。測定を行うためか解析のみを行うかを選択する。

(2) 図3B

コンピュータの画面上に切り替え表示される測定中のソフトウェアのウインドウを示す。右上の升目上の部分で選択したプレートの穴の番地の測定値が下の描画領域にリアルタイムで表示される。

【0040】

(3) 図3C

コンピュータの画面上に切り替え表示される解析ウインドウ。解析時の標準ウインドウで、ここから下記図3(E)や図3(F)、図3(G)のウインドウを呼び出すことができる。解析結果の表示や印刷、表計算ソフトへの出力などもこのウインドウから行う。

(4) 図 3 D

コンピュータの画面上に切り替え表示されるプレート全体（96 試料）の一括表示ウィンドウ。図 3（B）からでも図 3（C）からでも呼び出すことができる。

(5) 図 3 E

コンピュータの画面上に切り替え表示される解析条件入力ウィンドウ。解析のための計算方法や条件を入力するウィンドウ。

計算方法は大きく二つに分かれるのでそれぞれ毎に説明する。関連がある上述の部分の解析方法の説明参照。

【0041】

① 計算方法 A

ピーク認識法：上記の視察法で元データの山を認識して解析する。

ボトム認識法：上記の視察法で元データの谷を認識して解析する。

これらの解析方法はきれいなリズムの山や谷の位相を正確に計算できる。また自動認識した山の位置などを手動で修正することで、正しい値を計算し直させることができる。ノイズの多いデータの解析には不向きである。

計算条件

解析データ範囲：元データうち、解析すべきデータ範囲を指定する。標準で全領域になっている。

【0042】

スムージング ON/OFF：標準で ON になっている。解析の前に元データをそのまま解析するか、移動平均を取って滑らかにしたものを解析するかを選択する。

計算周期範囲：標準で ON になっている。認識した山や谷の間隔がここで指定した値から外れた場合には、自動的に山を追加したり、削除したりして補正する。

【0043】

② 計算方法 B

パワースペクトル法：パワースペクトル法で最も近似する正弦波を計算する。

この解析方法はノイズの多い場合や、間隔が開いているデータの解析に向いてい

る。また、元データに含まれている複数のリズム成分を計算することが可能である。ノコギリ状のリズムでは山や谷の位相の計算がずれること、間違った計算をしたときに手動修正ができないのが欠点である。

【0044】

計算条件

解析データ範囲：元データうち：解析すべきデータ範囲を指定する。標準で全領域になっている。

簡易計算ON/OFF：標準でON になっている。これがON になっていると元データから複数のリズム成分の解析を行わなくなり、計算する周期の範囲も「計算周期範囲」で指定した範囲に限定される。結果として解析速度が上昇し、長期間のデータのうねりをリズムとして誤認することが無くなる。

計算周期範囲：標準でON になっている。パワースペクトルで近似計算する正弦波の周期はここで指定した範囲内で行われる。

【0045】

(5) 図3 F

コンピュータの画面上に切り替え表示される統計処理ウィンドウ。全プレート of データを統計処理し、ヒストグラムでその結果を表示・印刷できる。

(6) 図3 G

コンピュータの画面上に切り替え表示されるピックアップ・ウィンドウ。標準から外れた値を示す試料を選び出すための条件を設定するウィンドウ。この機能で選択された試料のデータは図3 (C) の右上のウェル選択部分に黒いマークが付く。これは、突然変異体のスクリーニングのためのものである。「標準から外れた値を示す試料を選び出すための条件を設定」は、標準幅を予め設定して、その上限下限を外れるものが突然変異体とすることを意味する。

【0046】

【実施例】

生物試料発光測定用96穴プレートを測定機の培養台にセットし、試料を培養しながら測定を開始する。測定装置の搬送手段が試料を順番に測定室に送り込み、測定室内のセンサー：光電子増倍管が各穴の生物発光量を測定し、測定終了後

に測定機本体のコンピュータが測定データを本発明のプログラムを収納する外部コンピュータに転送する。外部コンピュータは測定データの解析と表示とをリアルタイムで行う。搬送手段は測定終了後のプレートを培養台の元の位置に戻し、次のプレートの搬送に移る。この操作を全てのプレートに対して繰り返す（図 2）。

【 0 0 4 7 】

本プログラムは測定期間中に測定結果をリアルタイムで表示することができる（図 3 B）。リアルタイムで測定結果を見ることができるので、測定中に刺激を与えた際の反応を見るなどの柔軟な実験を行うことができ、また、測定を必要最小限の時間で切り上げて次の実験に移ることができる。データを見る際に 9 6 穴プレートのデータの同時表示や異なるプレートのデータを並べて同時に表示できるため、比較検討が容易である（図 3 D）。解析は測定途中のデータに対しても行うことが可能である（図 3 C）。突然変異体のスクリーニングの際には、専用のウィンドウで統計的な処理を行って特異的な値を示す試料を容易に選別することができる（図 3 F、図 3 G）。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 A は生物発光を行う生物発光遺伝子組換え生物（試料）の模式図であり、図 1 B は測定に用いる生物を 9 6 穴プレートに植え込んだ測定試料の一部の写真である。

【図 2】 生物発光法による遺伝子発現の測定の手順を説明するための生物試料発光測定装置の模式的説明図である。

【図 3】 解析ソフトの持つウィンドウとその機能を説明するもので、図 3 A はコンピュータのソフト起動ウィンドウを示し、図 3 B はコンピュータの画面上に切り替え表示される測定中のソフトウェアのウィンドウを示し、図 3 C はコンピュータの画面上に切り替え表示される解析ウィンドウを示し、図 3 D はコンピュータの画面上に切り替え表示されるプレート全体（9 6 試料）の一括表示ウィンドウを示し、図 3 E はコンピュータの画面上に切り替え表示される解析条件入力ウィンドウを示し、図 3 F はコンピュータの画面上に切り替え表示される統計処理ウィンドウを示し、図 3 G はコンピュータの画面上に切り替え表示されるピッ

クアップ・ウィンドウを示す。

【図4】 図3のA, E, FおよびGを3A、3E、3Fおよび3Gと表示して示す。

【図5】 図3のBを3Bと表示して示す。

【図6】 図3のCを3Cと表示して示す。

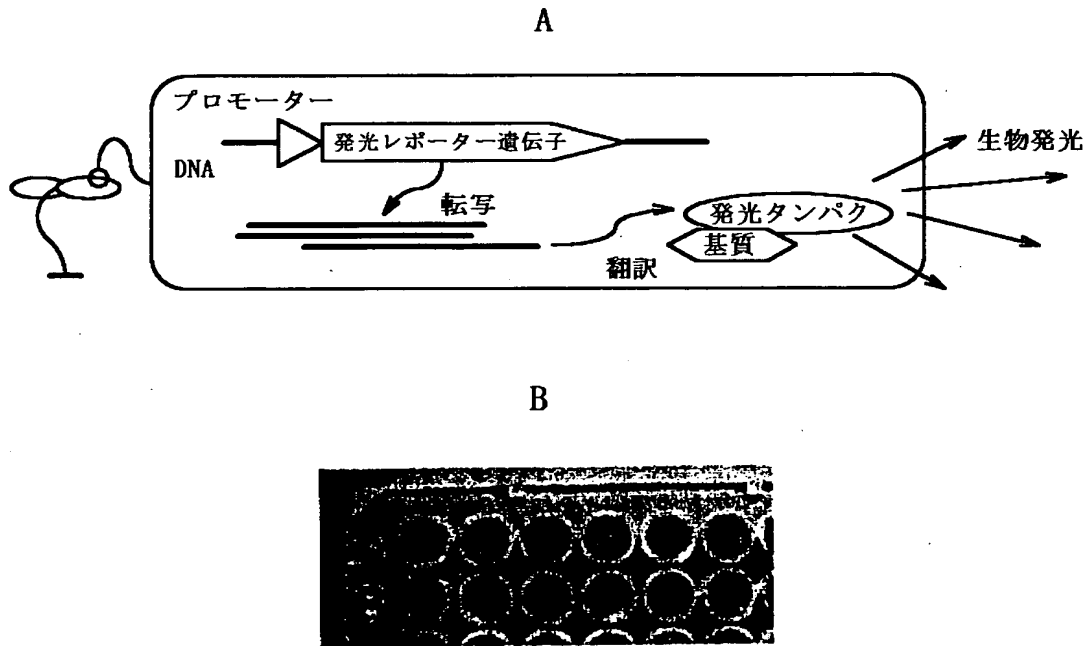
【図7】 図3のDを3Dと表示して示す。

【符号の説明】

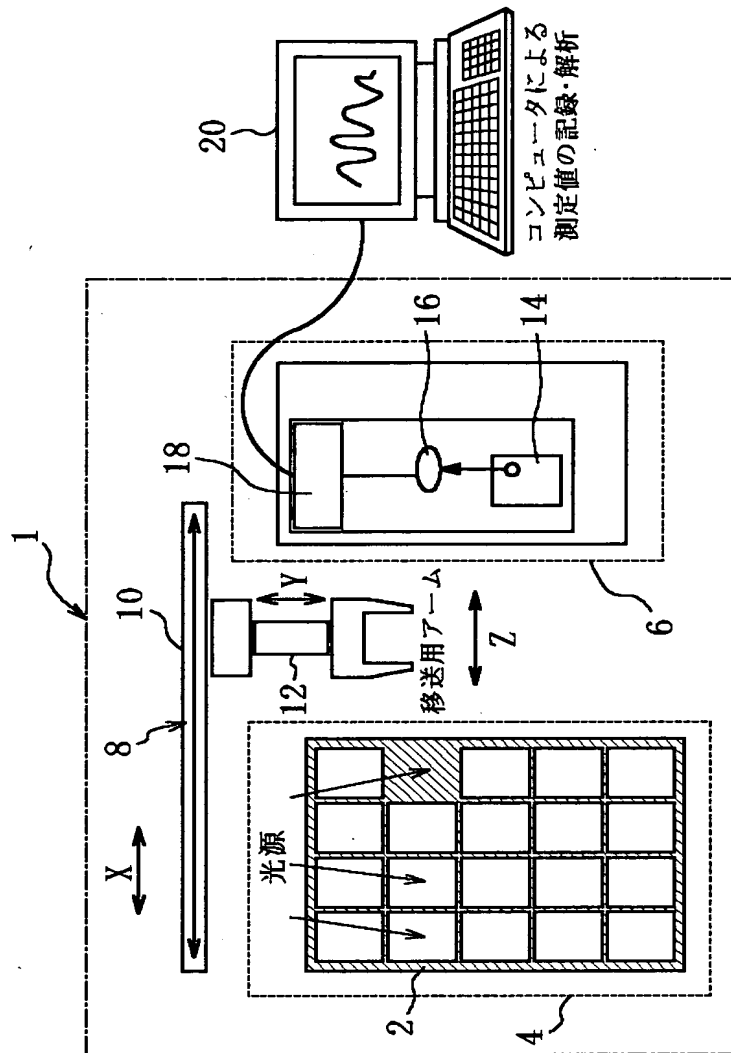
- 1 生物試料発光測定装置
- 2 生物試料（96プレート）
- 4 培養部
- 6 発光測定部
- 8 搬送手段
- 10 搬送レール
- 12 移送用アーム
- 18 コンピュータ
- 20 表示・解析コンピュータ

【書類名】 図面

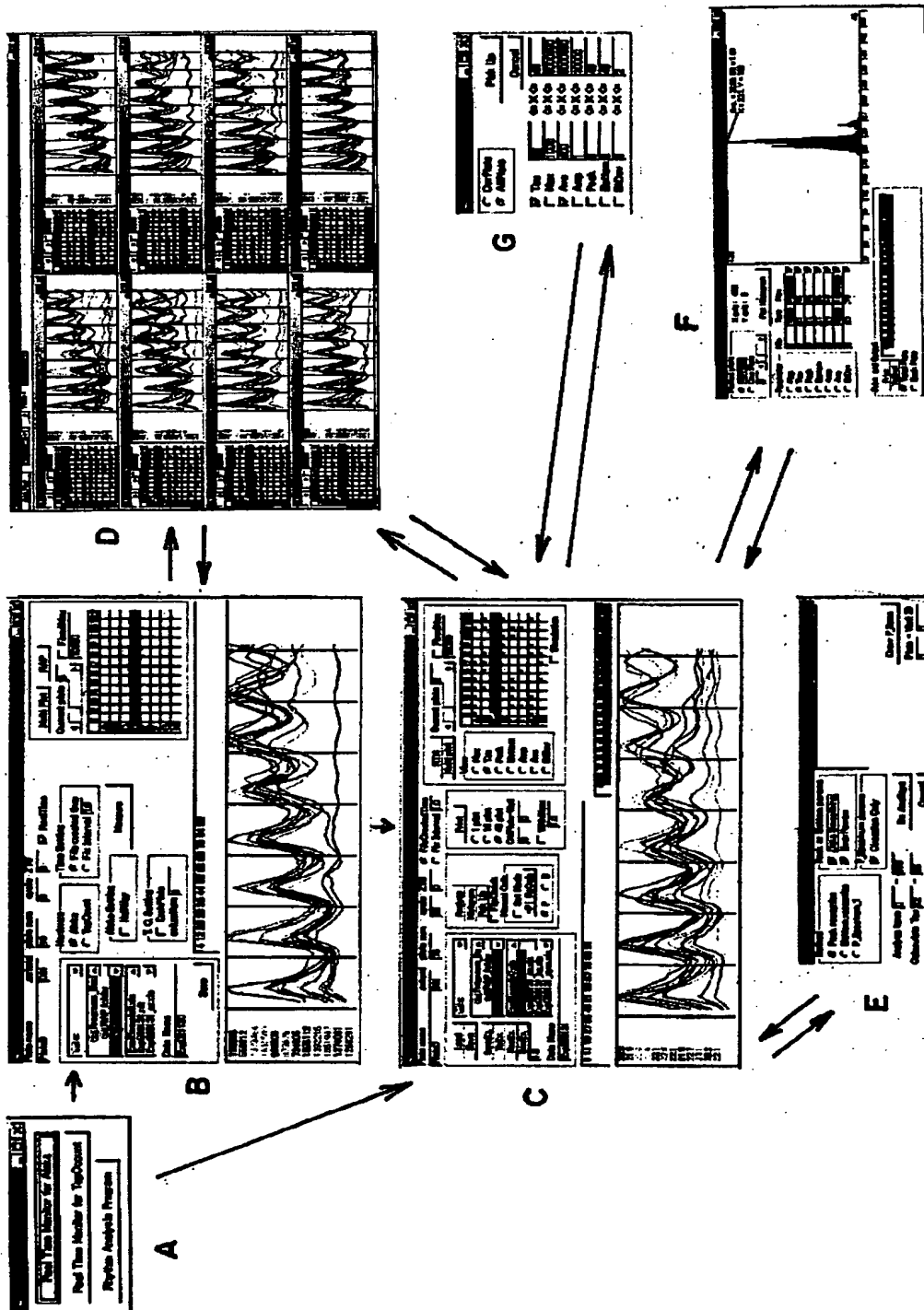
【図1】



【図 2】



【図 3】



【図 4】

3A

RAP start up

Real Time Monitor for Aloka

Real Time Monitor for TopCoount

Rhythm Analysis Program

3G

Data Pick Up

OurPlate

AllPlate

Pick Up

Cancel

Tau 48

Max 1000

Ave 600

Amp 1

Peak 0

Bottom 0

StDev 0

48

9000000

9000000

10000

48

48

2

3E

Analysis params

Method

Peak recognize

Bottom recognize

P_Spectrum_1

Peak or Bottom params

Data Smoothing

Error Farrow

P_Spectrum params

Circadian Only

Analyze term 0 - 999

Calculate Tau 12 - 36

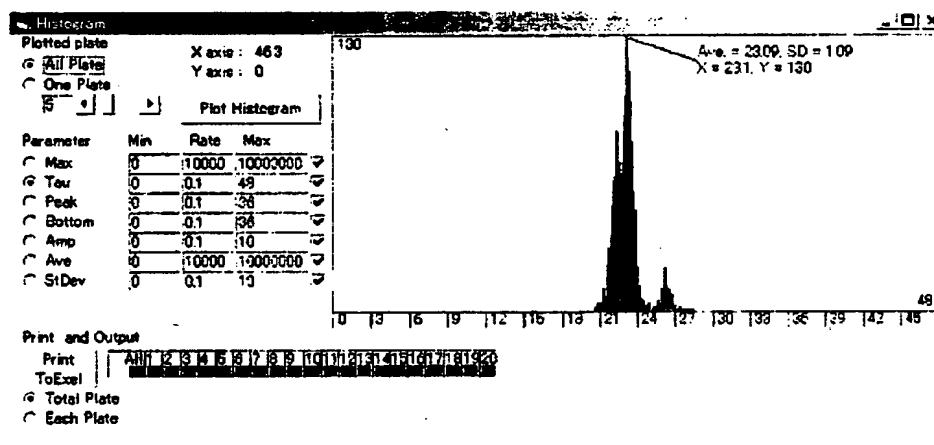
Do Analysis

Cancel

Draw F_Spec

Plate - Well ID

3F

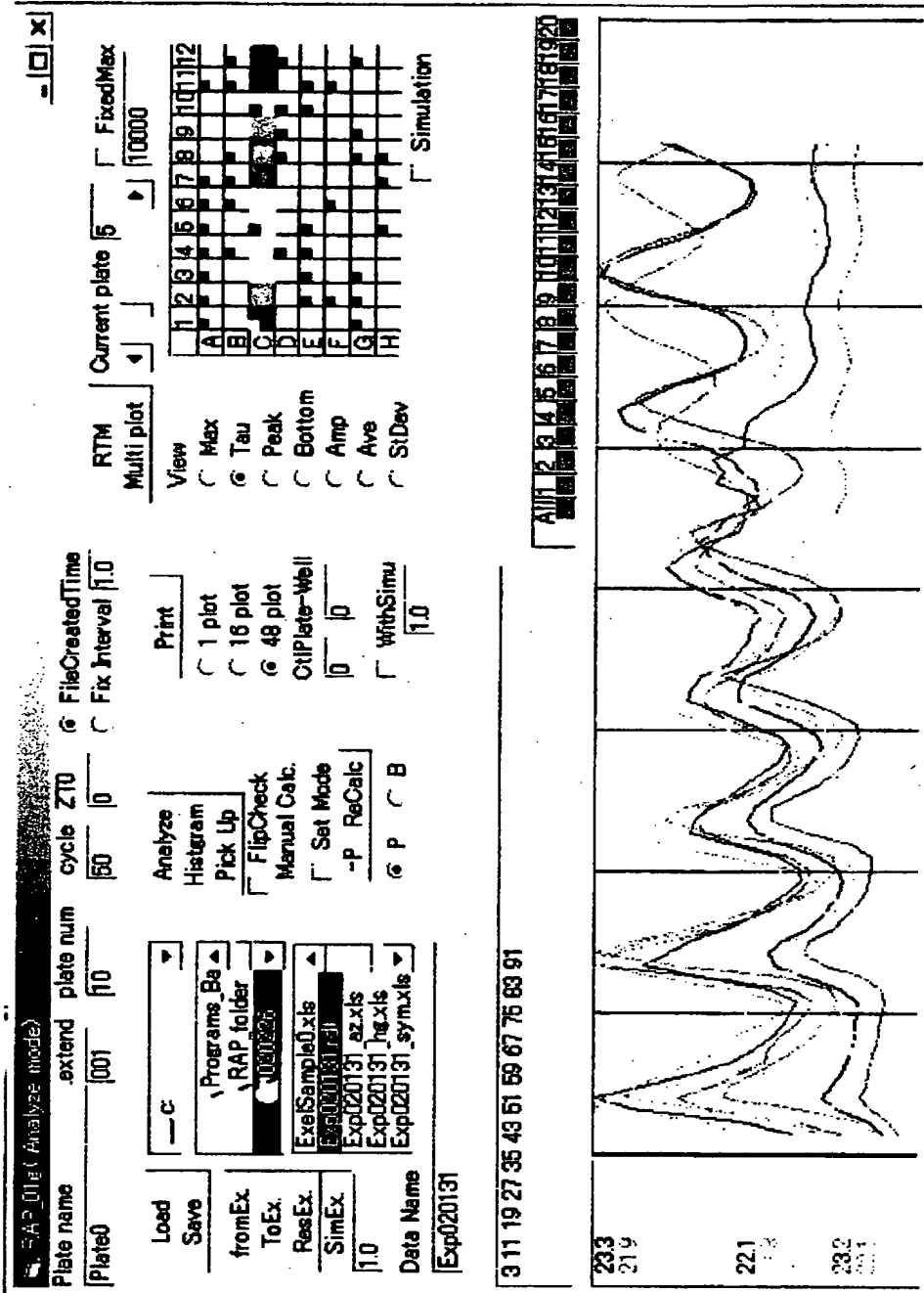


【图 5】

RAP_Mg (Monitoring mode)																																																																																																																						
Plate name	extend plate num cycle ZT0																																																																																																																					
Plated	[10] [0] [0] [✓] RealTime																																																																																																																					
	Hardware																																																																																																																					
	<input checked="" type="radio"/> Aloka																																																																																																																					
	<input checked="" type="radio"/> TopCount																																																																																																																					
	Aloka Setting																																																																																																																					
	<input type="checkbox"/> HalfWay																																																																																																																					
	T.C. Setting																																																																																																																					
	<input type="checkbox"/> EachPlate																																																																																																																					
	columnNum [1]																																																																																																																					
	Measure																																																																																																																					
	Time Setting																																																																																																																					
	<input checked="" type="radio"/> File created time																																																																																																																					
	<input type="radio"/> Fix Interval [1.0]																																																																																																																					
	Multi Plot RAP																																																																																																																					
	Current plate [5] FixedMax																																																																																																																					
	[<] [>] [10000]																																																																																																																					
	<table border="1"> <tr> <th></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> </tr> <tr> <th>A</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <th>B</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <th>C</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <th>D</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <th>E</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <th>F</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <th>G</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <th>H</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A													B													C													D													E													F													G													H												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																										
A																																																																																																																						
B																																																																																																																						
C																																																																																																																						
D																																																																																																																						
E																																																																																																																						
F																																																																																																																						
G																																																																																																																						
H																																																																																																																						
Data Name																																																																																																																						
[Exp021130]																																																																																																																						
Save	4 12 20 28 36 44 52 60 68 76 84 92																																																																																																																					
192088 559919																																																																																																																						
724005 199117																																																																																																																						
1374061 199117																																																																																																																						

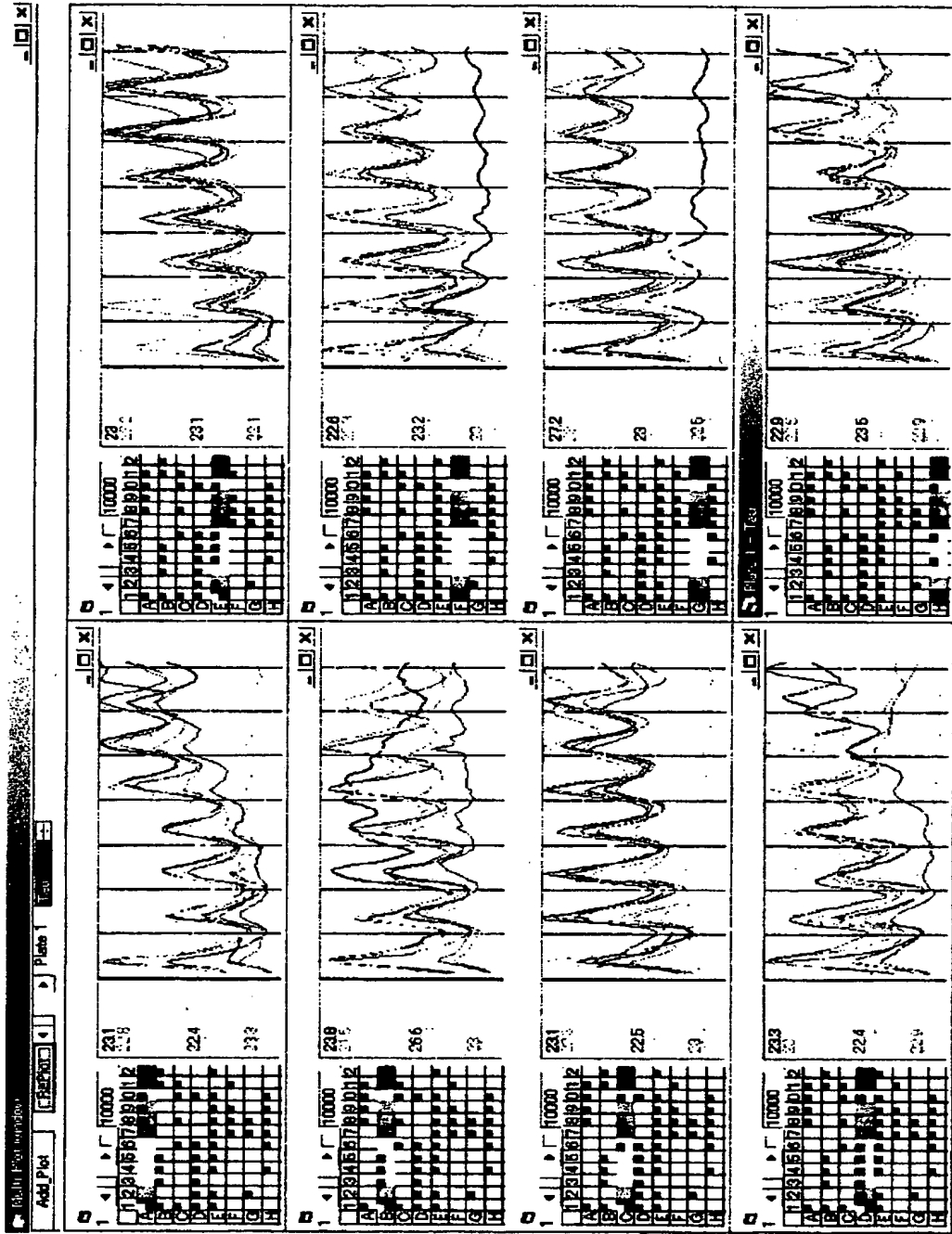
【図 6】

3C



【図 7】

3D



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 コンピュータを用いて、生物発光リアルタイム測定法の長所を最大限に活用し、測定の大規模化に対応する、データの表示・解析を可能とするコンピュータプログラムを提供することを目的とする。

【解決手段】 コンピュータに対して、所定時点でリアルタイムに送られてくる生物試料の発光測定結果信号を受ける機能と、該生物試料発光測定結果信号に基づいて生物試料発光測定結果をリアルタイムで表示し保持する機能と、所定時間後にリアルタイムに送られてくる新たな生物試料発光測定結果信号を受ける機能と、該新たな生物試料発光測定結果信号に基づいて該生物試料発光測定結果を該新たな生物試料発光測定結果にリアルタイムで更新表示し保持する機能とを繰り返し実行させる、生物試料発光測定・解析プログラム。

【選択図】 図 2

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-061203
受付番号	50300373063
書類名	特許願
担当官	第七担当上席 0096
作成日	平成15年 3月10日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	391012224
【住所又は居所】	愛知県名古屋市千種区不老町（番地なし）
【氏名又は名称】	名古屋大学長

【代理人】

申請人

【識別番号】	100072051
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階
【氏名又は名称】	杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】	100059258
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階
【氏名又は名称】	杉村 暁秀

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [391012224]

1. 変更年月日 1991年 1月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県名古屋市千種区不老町 (番地なし)

氏 名 名古屋大学長